

دراسة كيموحيوية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي من بكتريا *Staphylococcus aureus*

نجوى ابراهيم خليل

ابتهاال ادريس كنعان*

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل

كلية علوم البيئة وتقاناتها/ جامعة الموصل

*E-mail: Kanaanedrees@Gmail.com

(أستلم 27 /6 /2018 ؛ قُبل 1 /11 /2018)

الملخص

سعت الدراسة الحالية باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة الى عزل وتنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase من المستخلص البروتيني الخام (رائق الخلايا المتكسرة) من بكتيريا *Staphylococcus aureus*، وذلك حسب الخطوات المدرجة في أدناه:

الأولى: التحقق من وجود الانزيم في البكتيريا، اذ تم تشخيص البكتيريا باستخدام شريط API₂₀ الذي يحتوي على (20) اختباراً، وتبين لدينا ان البكتيريا المختبرة هي *Staphylococcus aureus*، وتم عزل الإنزيم للتأكد من وجوده في هذه البكتيريا ضمن الطور اللوغارتمي وذلك بتتميتها لمدة 18 ساعة في الوسط الغذائي المناسب، وتبين انه من النوع الداخلى خلويًا بدلالة وجود فعالية للإنزيم في رائق الخلايا المتكسرة دون وجودها في الرائق الخالي من الخلايا البكتيرية.

الثانية: تنقية الإنزيم، تمت عملية تنقية الإنزيم على ثلاث مراحل هي: الترسيب بكبريتات الأمونيوم، ومن ثم الفرز الغشائي وأخيرا إمراره بعمود الفصل الكروماتوغرافي باستخدام هلام السيفادكس Sephadex G -100 حيث قدرت الفعالية النوعية بعد عملية التنقية الأخيرة بحوالي 16.2 مرة بالمقارنة مع فعاليته قبل التنقية (في المستخلص البروتيني الخام). كما تم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي تعيين الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي الذي قدر بـ (51,000) دالتون.

الثالثة: قياس فعالية الإنزيم في الحيوانات المختبرية، أظهرت النتائج وجود زيادة ملحوظة في فعالية الإنزيم في مصل دم الفئران المحقونة بالبكتيريا المرضية مقارنة بفعاليته في مصل دم الفئران السليمة (غير المحقونة).

الكلمات الدالة: إنزيم الفوسفاتيز القاعدي، بكتريا *Staphylococcus aureus*، الوزن الجزيئي.

Biochemical Study of Alkaline Phosphatase in *Staphylococcus aureus*

Najwa I. Khaleel

Ibtihal E. Kanaan

Department of Biology/College of Education Pure Science/University of Mosul
College of Enviromental and Technology/ University of Mosul

ABSTRACT

The present research aimed isolating and purifying Alkaline phosphatase enzyme from crude protein extract (Lysate supernatant) of *Staphylococcus aureus* by using different biotechnologies. To proceed, the following steps were achieved:

Firstly, The verification of the existence of enzyme in bacteria, the bacteria were diagnosed by using the API₂₀ stripe that consists of (20) items. It had been detected that the experimented bacterium was *Staphylococcus aureus*, the enzyme was isolated from this bacterium to ensure its availability in it within the logarithmic phase and this was done through growing it for 18 hours in a suitable growth medium. It had been detected that the enzyme was intracellular because of the occurrence of enzyme activity in the lysate supernatant without occurring it in the cell free culture supernatant.

Secondly, Enzyme purification, the enzyme had been purified through three stages: precipitation of protein by ammonium sulphate, dialysis and finally, the protein extract was passed through column chromatography by using Sephadex G-100 gel, the estimated enzyme activity after this step was 16.2 in comparison with its activity before the purification processes (crude protein extract). The approximate molecular weight of alkaline phosphatase was estimated by using gelatinous filtration technique and it was 51.000 Dalton.

Thirdly, Measuring of the enzyme activity in the experimented animals, the results showed an increase of enzyme activity in the blood serum of mice injected with pathological bacteria in comparison with its activity in the blood serum of healthy mice, i.e. the intact ones.

Keywords: Alkaline phosphatase, *Staphylococcus aureus*, molecular weight.

المقدمة

بكتيريا *Staphylococcus aureus*

شخص بكتيريا المكورات العنقودية لأول مرة Sir- Alaxander Ogston in Aberdeen-Scotland، في عام 1880 في قبح الخراجات الجراحية (Ogston, 1882) يقع النوع *Staphylococcus aureus* ضمن جنس *Staphylococcus*، وعائلة Micrococcaceae، وهي بكتيريا موجبة لصبغة كرام، ولا هوائية اختيارية، وغير متحركة، وغير مكونة للسبورات، وكروية الشكل يتراوح قطرها بين (0.5-1.5) مايكروميتر، تظهر تحت المجهر بشكل أزواج أو سلاسل قصيرة أو بشكل عنقايد وذلك نتيجة لانقسامها بأكثر من مستوى، موجبة لفحص التجلط Coagulase (Bhatla and Zahoor, 2007; Cassate et al., 2006).

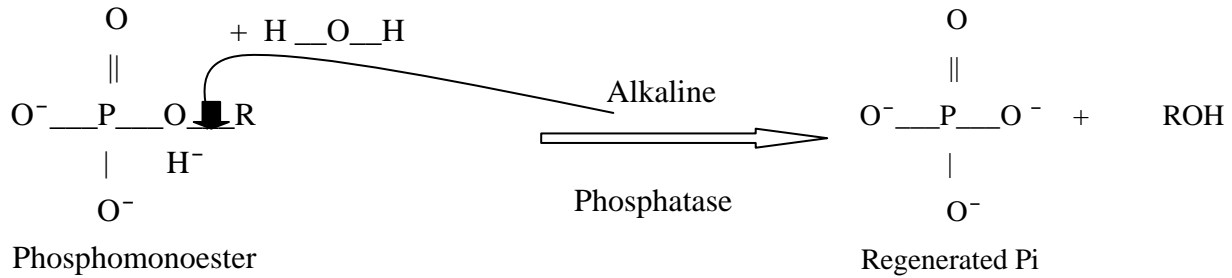
تتواجد البكتيريا بصورة طبيعية في الهواء والغبار ومياه المجاري والأطعمة والمجاري التنفسية للإنسان وعلى الشعر (Malik, 1996) كما تتواجد على الجلد (Noble, 1998) وفي فتحة المنخر nostril، تعد بكتيريا *Staphylococcus aureus* من الممرضات ذات الأهمية المتزايدة بسبب مقاومتها المستمرة للمضادات الحيوية (Lowy, 1998) مسببة أمراضاً مختلفة وخاصة في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة حيث تؤدي إصابتهم بهذه البكتيريا إلى ظهور أعراض حادة قد تؤدي بهم إلى الموت لذلك فقد عدت بكتيريا انتهازية (Foster, 2005) مسببة إصابات الجلد الثانوية والخراجات Abscesses وإصابات الجهاز التنفسي، وإصابات المجاري البولية، والتهاب العظم Osteomyelitis، والتهاب شغاف القلب Endocarditis (Bhatla and Zahoo, 2007).

Alkaline phosphatase

إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

يشار لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي بالرمز ALP (EC 3.1.3.1)، (McComb et al., 1979)، والذي أقرته الجمعية الدولية للإنزيمات ويسمى إنزيم الفوسفاتيز القاعدي بـ Orthophosphate monoester-phosphohydrolases (Trowsdale et al., 1990)، وهو من إنزيمات التحلل المائي hydrolases (Spiro, 1973)، ومن الإنزيمات المعدنية metalloenzyme (Le

(Du *et al.*, 2001)، لاحتواء مواقعه الفعالة على أربعة أيونات زنك Zn^{+2} وإيوني مغنيسيوم Mg^{+2} (Coleman *et al.*, 1983)، كما أشار العديد من الباحثين إلى أن خصوصية الإنزيم الواسعة للمواد الأساس (Fernely, 1971) أدت إلى دراسة دوره في عمليات: تحليل كل من المركبات الفوسفاتية أحادية الاستر (Bradshaw *et al.*, 1981)، والنهايات الفوسفاتية للحامض النووي DNA (Sowadaki *et al.*, 1985)، وفي نقل الفوسفات إلى مستقبلاتها Trans phosphorylation، لاسيما عند وجود التراكيز العالية من المستقبلات الفوسفاتية مثل Tris – buffer و Ethanol amine (Trowsdale *et al.*, 1990)، والتي تتم تحت ظروف قاعدية (pH 11.0 – 7.5) ونقص الفوسفات (Dhaked *et al.*, 2005)، وبحسب المعادلة الآتية: (Liang and Blake, 2006).



ويتموضع إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في البكتيريا داخل الفسحة المحيطة بالبلازما periplasmic space (Wyckoff, 1987)، وبالغشاء البلازمي في اللبائن (Trowsdale *et al.*, 1990) وهذا يفسر دوره في الأخيرة بميكانيكيات النقل الخلوي (Mc Comb *et al.*, 1979).

ويبدأ تصنيع الإنزيم في طور النمو اللوغارتمي وتحت ظروف نقص الفوسفات phosphate limitation (Wang *et al.*, 2005) في سايتوبلازم بكتريا *Staphylococcus aureus* الموجبة لفحص التجلط Coagulase دون البكتيريا السالبة لهذا الفحص لذلك يساعد وجود الإنزيم في هذه البكتيريا بشكل غير مباشر على تحديد البكتيريا المنتجة لأنزيم التجلط (Baird-Parker, 1965).

ويكون إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في اللبائن من بروتين سكري glycoprotein (OMoss *et al.*, 1966)، يحتوي ما بين 12% إلى 15% (Fosset *et al.*, 1974) كاربوهيدرات من الوزن الكلي للبروتين، لكن لا توجد أية أدلة على مشاركة وحدات الكاربوهيدرات في التحفيز (Berenson *et al.*, 1966) ويرتبط الإنزيم بالغشاء البلازمي في أغلب الخلايا الحيوانية (Bortolato *et al.*, 1999)، الذي يتحرر من الغشاء إلى مجرى الدم في حالة الالتهابات Inflammation وعند تجديد وإعادة انقسام الخلايا Remodelling and cell proliferation (Abe T *et al.*, 2001)، و في سوائل الجسم والخلايا السرطانية ولذلك يستخدم لتتبع تطور الأمراض الخبيثة (Hofmann and Milla'n, 1993)، ويمتلك الإنزيم وزناً جزيئياً يتراوح بين 170,000-130,000 دالتون (Kim and Wyckoff, 1990)، كما يؤدي دوراً دفاعياً متمثلاً في إزالته للفوسفات من جزيئه ATP الخارج خلوية التي تعتبر ك Pro-inflammatory (Picher *et al.*, 2003) وله دور خلال الاستجابة الالتهابية الحادة Acute inflammatory response من خلال إزالته للفوسفات الداخلية Endogenous dephosphorylating عندما تكون الحاجة إليها كبيرة (Le Du *et al.*, 1985).

المواد وطرائق العمل

بكتيريا *Staphylococcus aureus*: تم الحصول عليها من مختبرات البكتريولوجي/ مستشفى السلام التعليمي في الموصل، وشخصت باستخدام شريط (API 20) Biomerieux France , nalytical profile Insera .

عزل وتنقية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

- تحديد طور النمو اللوغارتمي للبكتيريا:

تم تحديد هذا الطور من خلال قياس عكورة العالق البكتيري في وسط المرق المغذي Nutrient broth بعد كل ساعتين من التحضين في حاضنة هزازة (180 دورة/ دقيقة) من نوع (Gallen Hamp, England) وبدرجة حرارة (37) م° ولمدة (24) ساعة، باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer (Sartorius BL 210S, Labomed, Inc sepectrosc)، عند الطول الموجي (600) نانومتر (Harris et al., 2002).

- تحضير المعلق الجرثومي

أعد وسط المرق المغذي في دورق زجاجي بحجم (1000سم³) وعقم بالموصدة Autoclave، ثم ترك الوسط ليبرد إلى درجة حرارة (45 - 50) م° ولقح الدورق ببكتيريا *Staphylococcus aureus*، وحضن لمدة (18) ساعة عند درجة حرارة (37) م° في حاضنة هزازة (180 دورة/ دقيقة).

- عزل إنزيم الفوسفاتيز القاعدي

قيست عكورة العالق البكتيري المستحصل عليه من الفقرة السابقة عند الطول الموجي (600) نانومتر، ورسبت الخلايا البكتيرية باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling ultracentrifuge من نوع (Heraeus chrest Gm bH , Cryofuge 6- 4)، بدرجة حرارة (4) م° لمدة 30 دقيقة، وغسلت الخلايا المترسبة (3) مرات باستخدام المحلول الدائري mM Tris - HCL buffer PH (10 8.0) (Kumar et al., 2008).

وحطمت جدران الخلايا البكتيرية باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic نوع (MSE, SEP. No PG 1545) وذلك بتعريضها لـ (20,000) ذبذبة/ ثانية، لمدة (30) ثانية وكررت العملية (3) مرات. وفصل الرائق عن راسب الخلايا المتكسرة باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد، وحفظ رائق الخلايا المتكسرة عند درجة حرارة (4) م° (Hostacka et al., 1993).

مراحل تنقية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي

- ترسيب البروتين باستخدام كبريتات الامونيوم:

تم إضافة كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة إلى رائق الخلايا المتكسرة ويتشبع كامل إلى (75%) مع تحريك المزيج بالمحرك المغناطيسي وبدرجة حرارة (4) م°، ثم فصل المزيج بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (30) دقيقة، بعدها تم الحصول على الراسب وأذيب في المحلول الدائري 100 mM Tris HCL buffer PH 9.8 (Kumar et al., 2008; Robyt and White, 1987).

- الفرز الغشائي:

تمت عملية الفرز الغشائي من خلال وضع المحلول البروتيني المحضر في الفقرة السابقة في أكياس السيلوفان المحكمة الربط، ثم

غطست في وعاء حجمي يضم المحلول الدارئ 100 mM Tris HCL buffer PH 9.8 (Kumar *et al.*, 2008).

- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

أ- تحضير الهلام:

استخدم الهلام من نوع Sephadex - G100 (Husson *et al.*, 1989)، الذي يفصل المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية التي تقع ضمن المدى (4000 - 150000) دالتون (المظفر، 1999).

ب- تعبئة العمود:

استخدم عمود الفصل ذي الأبعاد (1.7×75) سم لفصل الإنزيم الذي تم تعبئته بسكب الهلام بهدوء على جدران العمود مع مراعاة عدم تكون الفقاعات، وغسل العمود مرتين بقدر حجمه بالماء المقطر وبذلك أصبح العمود جاهزا للاستخدام (Robyt and White, 1987).

- إضافة المواد القياسية:

تم تقدير حجوم الاسترداد لخمسة بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي، وهي البومين مصل البقر والبومين البيض وأنزيم الببسين الجزيئي والأنسولين.

ج- إضافة النموذج:

تم حقن (2.5) سم³ من المحلول البروتيني الناتج من الفرز الغشائي والمواد القياسية بشكل دائري على جدران العمود تبعه إضافة (2.5) سم³ من الماء المقطر، الذي تم استخدامه كمحلول روغان Elution solution لغرض دفع النموذج داخل العمود، ثم استرداد المادة البروتينية يدويا ومتابعة محتواها البروتيني من خلال قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر باستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectrophotometer من شركة APEL.

فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي في كل جزء من الأجزاء المفصولة عند حقن المحلول البروتيني المجهول في عمود الفصل لغرض متابعة الإنزيم خلال عملية الفصل، ليتم بعد ذلك جمع الأجزاء البروتينية ذات الفعالية الأنزيمية. ثم رسم علاقة خطية بين حجوم استرداد البروتينات القياسية ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة لغرض استخدامها في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي (Robyt and White, 1987).

د- تقنية التجفيف بواسطة التبريد (التجفيد):

تم تركيز الحزمة البروتينية الناتجة من تقنية الترشيح الهلامي باستخدام جهاز التجفيد بعد تجميدها بدرجة حرارة (-20) م° لغرض الحصول على محلول بروتيني مركز.

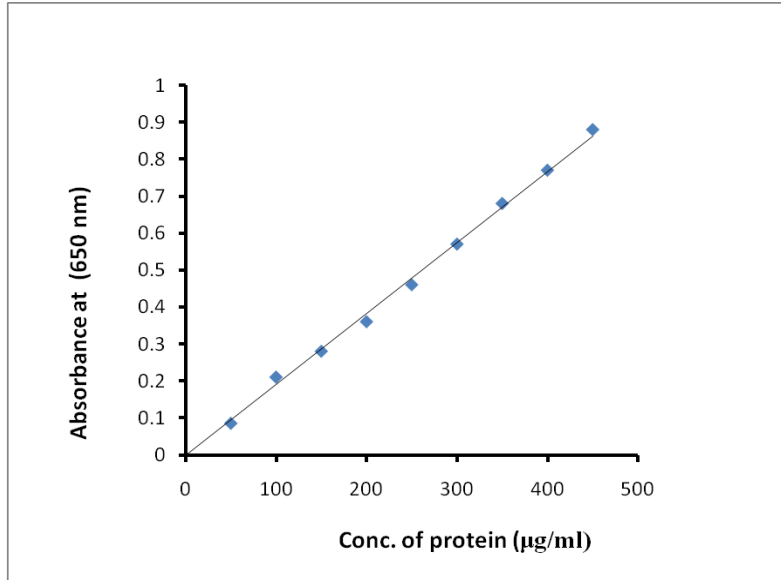
- تقدير فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي:

تم تقدير فعالية الإنزيم في كل من رائق الخلايا المتكسرة والرائق الخالي من الخلايا وبعد كل خطوة من خطوات التنقية وذلك باستخدام العبوة الجاهزة (Phosphatase alkaline - Kite) والتي صنعتها شركة Biomerieu xsa.

- تقدير كمية البروتين:

قدرت كمية البروتين في كل من رائق الخلايا المتكسرة والرائق الخالي من الخلايا وبعد كل خطوة من خطوات التنقية باستخدام طريقة فولن، لاوري Folin - Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) التي طورها الباحثان (Schacterle and Pollak, 1973). استخدم البومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin (BSA بوصفه

محلولاً قياسياً لتحضير المنحني القياسي للبروتين الذي له معامل امتصاص ضوئي (Extinction coefficient) يساوي 0.67 (Holme and Peck, 1988) ويوضح الشكل (1) المنحني القياسي النموذجي للبروتين.



الشكل 1: المنحني القياسي للبروتين

تحديد فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في الحيوانات المختبرية

- الحيوانات المختبرية المستخدمة:

استخدمت في الدراسة الحالية ذكور وإناث الفئران البيض السويسرية (Swiss albino mice *Mus musculus*) التي تراوحت أعمارها بين (8-10) أسبوعاً وزودت كلتا التربيّة والطب البيطري/ جامعة الموصل البحث بهذه النماذج.

- تحضير المعلق البكتيري:

حضر المعلق البكتيري من بكتيريا *Staphylococcus aureus* في وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (18) ساعة، ورسبت الخلايا البكتيرية باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة (5000 rpm) لمدة (30) دقيقة، وغسلت الراسب مرتين بمحلول الملح الفسلجي ثم علق الراسب بنفس المحلول المستعمل في حقن الحيوانات، علماً أن أعداد الخلايا البكتيرية فيه كانت $(10^8 \times 1)$ خلية/سم³ والمساوية لأنبوبة ماكفرلاند 0.5.

- سحب عينات الدم:

سحب الدم من زاوية العين باتجاه الضفيرة الوريدية خلف مقلة العين *Ophthalmic venous - plexus* باستخدام أنبوبة شعرية (Waynforth, 1980)، وترك الدم حتى تخثره في درجة حرارة الغرفة ثم اجري له طرد مركزي (5000 rpm) لمدة (30) دقيقة، لغرض قياس فعالية الإنزيم فيه وحسب الطريقة المشار إليها في الفقرة السابقة.

النتائج

تشخيص بكتيريا *Staphylococcus aureus*:

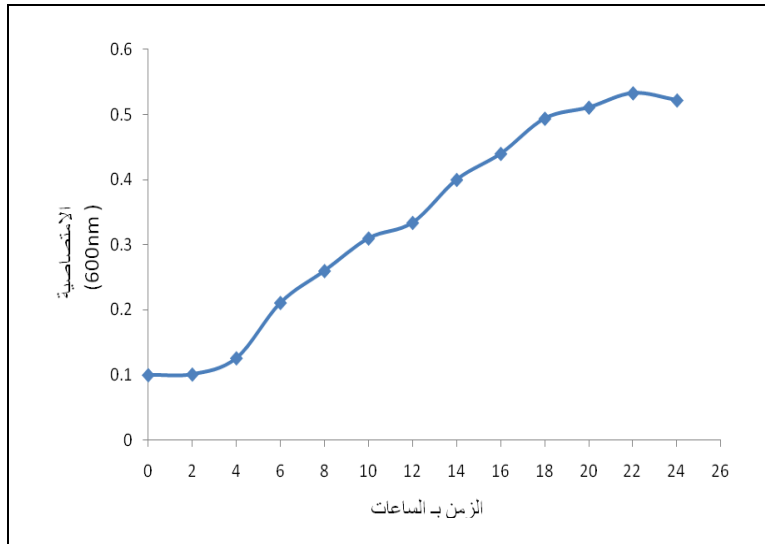
اعتماداً على الاختبارات البايوكيميائية الموجودة في شريط API₂₀ ، تم تشخيص البكتريا كما موضح في الشكل (2).



إنزيم الفوسفاتيز القاعدي:

أ- تحديد طور النمو اللوغارتمي:

تم تحديد طور النمو لبكتريا *Staphylococcus aureus*، باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer لحساب النمو البكتيري، وذلك بعد كل ساعتين من التحضين لمدة 24 ساعة، وتبين ان هذا الطور يبدأ تقريبا من الساعة (6) الى الساعة (22) كما في الشكل (3)، لذلك انتخبت البكتيريا بعمر (18) ساعة بوصفها طور النمو اللوغارتمي لاستخدامها في التجارب اللاحقة.



الشكل 3: منحنى النمو وتحديد الطور اللوغارتمي لبكتيريا *Staphylococcus aureus*

ب- تحديد موقع وفعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي:

تم تحديد موقع انزيم الفوسفاتيز القاعدي بدلالة قياس فعاليته حسب الفقرة (عزل الأنزيم) والموضحة في مواد وطرائق العمل،

وأظهرت النتائج عدم وجود فعالية للأنزيم في الراشح الخالي من الخلايا ووجوده في رائق الخلايا المتكسرة بجهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic اذ بلغت الفعالية الكلية فيه (1.32) وحدة (الجدول 1)، وكمية البروتين الكلي (27.4) ملغم الشكل (4)، والتي تؤكد على ان انزيم الفوسفاتيز القاعدي هو من الانزيمات الداخلية التي تتواجد داخل الخلايا وليس خارجها، وعليه فقد تم اعتماد رائق الخلايا المتكسرة بوصفه مستخلصاً خاماً للأنزيم في التجارب المتعلقة بتقنيته.

ج- تنقية أنزيم الفوسفاتيز القاعدي:

استخدم رائق الخلايا المتكسرة كمستخلص خام لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي الذي تمت تنقيته وحسب الخطوات المتسلسلة الآتية:

- ترسيب البروتين باستخدام كبريتات الأمونيوم:

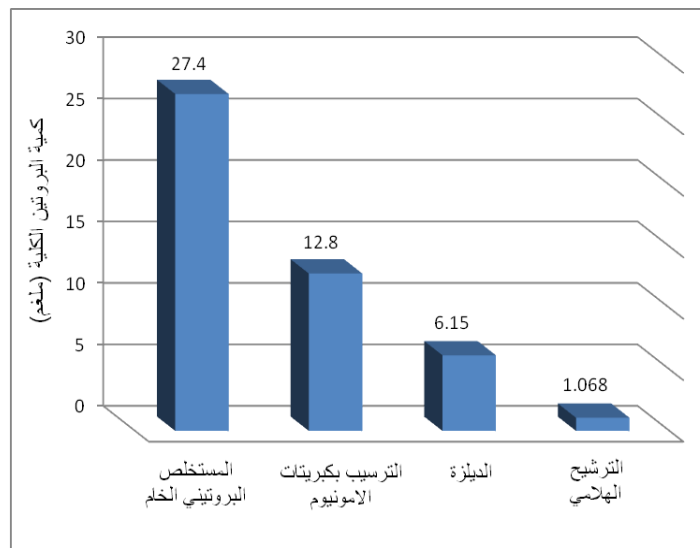
لوحظ ازدياد الفعالية النوعية للمستخلص البروتيني بمقدار (1.8) مرة مقارنة بالمستخلص الخام وكما هو مبين في (الجدول 1)، كما قدرت كمية البروتين فيه (حسب طريقة لاوري المطورة) حيث لوحظ انخفاض في كمية البروتين الكلية بالنسبة الى المستخلص الخام كما موضح في الشكل (4) .

- الفرز الغشائي:

أظهرت النتائج زيادة في الفعالية النوعية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي اذ بلغت (0.18) وحدة/ ملغم، كما في (الجدول 1)، فضلا عن إظهارها انخفاضاً في المحتوى البروتيني قياساً بالمستخلص البروتيني الخام كما موضح في الشكل (4).

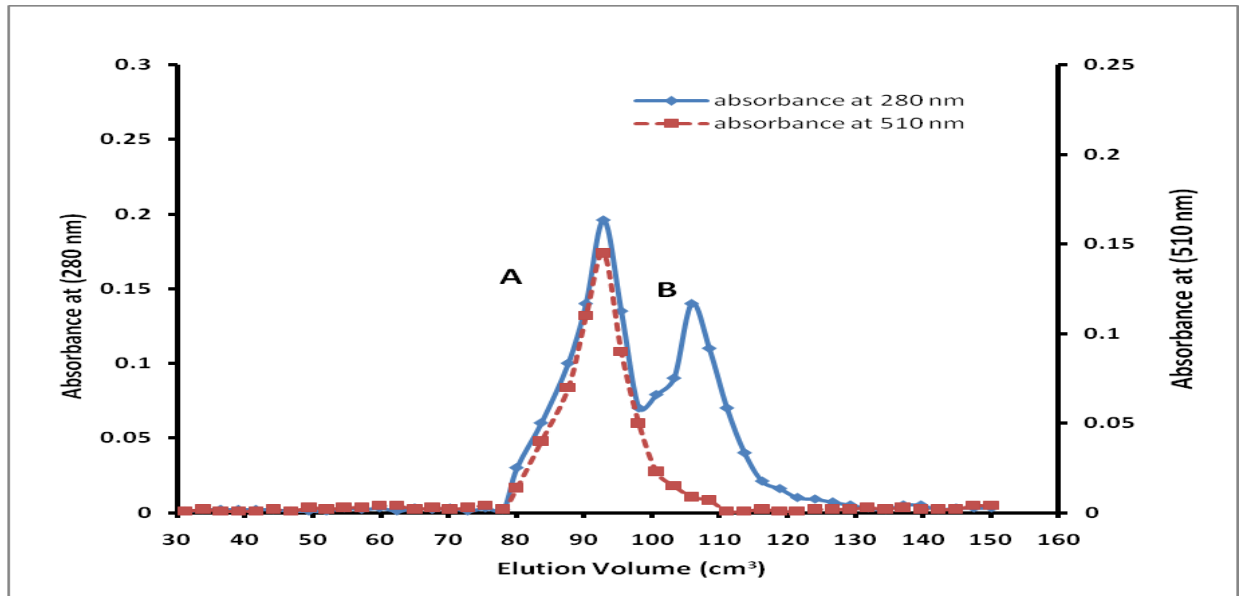
- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

بعد معاملة المستخلص البروتيني الخام بكبريتات الامونيوم واجراء عملية الفرز الغشائي عليه فصلت المركبات البروتينية فيه من خلال امراره بعمود الفصل الحاوي على هلام السيفادكس Sephadex G-100 الذي أعطى حزمتين بروتينيتين (A و B)، ومن خلال قياس فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في جميع الاجزاء التي جمعت كلاً على انفراد وجد ان الفعالية تتركز في الحزمة البروتينية (A) كما مبين في الشكل(5)، كما لوحظ ازدياد الفعالية النوعية بمقدار (16.2) مرة مقارنةً بفعاليتها في المستخلص الخام، كما هو موضح في (الجدول 1) الذي يؤكد حصول التنقية للأنزيم بواسطة هذه التقنية. فضلا عن وجود انخفاض في كمية البروتين الكلية خلال مراحل التنقية للأنزيم كما مبين في الشكل (4).



الشكل 4: كمية البروتين الكلية خلال مراحل التنقية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي لبكتيريا *Staphylococcus aureus*

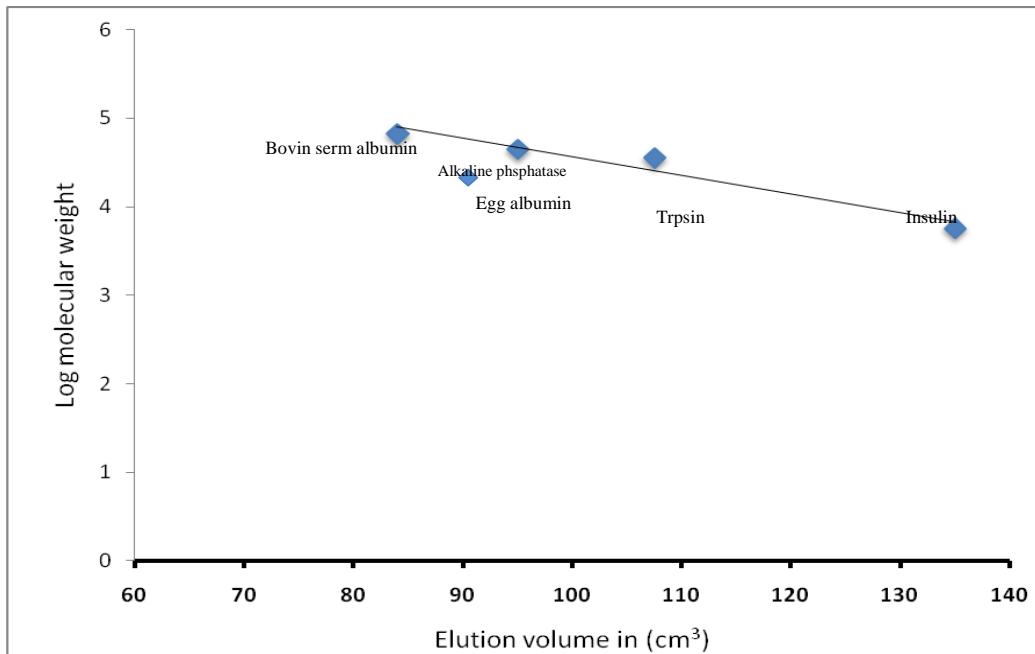
النسبة المئوية للاستعادة %	النسبة المئوية للزيادة في الفعالية النوعية %	الفعالية النوعية ** وحدة /ملغم	الفعالية الانزيمية الكلية وحدة (U)	الحجم سم ³	مراحل التنقية
100.0	1.0	0.05	1.32	20	المستخلص الخام
87.9	1.8	0.09	1.16	4	محلول راسب كبريتات الامونيوم
81.8	3.6	0.18	1.08	7.5	الفرز الغشائي
65.2	16.2	0.81	0.86	89	الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-100 القمة A

الجدول 1: مراحل تنقية انزيم الفوسفاتيز القاعدي من بكتيريا *Staphylococcus aureus*الشكل 5: المظهر الجانبي لروغان المحلول البروتيني لبكتريا *Staphylococcus aureus* بتقنية الترشيح الهلامي.

- تقدير الوزن الجزيئي لانزيم الفوسفاتيز القاعدي باستخدام تقنية الترشيح الهلامي:

تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية (A) لبكتيريا *Staphylococcus aureus* الحاوية على إنزيم الفوسفاتيز القاعدي حسب طريقة الباحث (Andrews, 1965) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي، حيث تم إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (2,000,000-204) دالتون على عمود الفصل لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (Vi) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (Vo).

ثم رسم المنحني القياسي كما في الشكل (6) معتمداً على حجم الروغان لكل مادة قياسية (ألبومين مصل البقر والبومين البيض وأنزيم الببسين الجزيئي والأنسولين) مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي الذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للانزيم (51,000) دالتون اعتماداً على حجم روغان الحزمة البروتينية (92.8) سم³.



الشكل 6: المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفادكس (Sephadex G-100)

المناقشة

قامت الدراسة الحالية على عزل وتنقية إنزيم لفوسفاتيز القاعدي من بكتريا مرضية كروية موجبة لصبغة كرام هي *Staphylococcus aureus* أُعتمد في تشخيصها على شكل خلاياها بعد صبغها بصبغة كرام وعلى الفحوصات البايوكيميائية الموجودة في شريط API₂₀ لكونه من الطرائق التشخيصية السريعة المستخدم عالميا فضلا عن السهولة والدقة في التشخيص. يُعد طور النمو اللوغارتمي من أهم الأطوار التي تمر بها البكتيريا خلال فترة نموها، وذلك لكون الخلايا فيه تكون ذات فعالية ابيضية عالية (الزدي، 1988) وذات خصائص فسيولوجية وكيميائية متميزة لذلك تكون البكتيريا في هذا الطور مناسبة لاستخدامها في الدراسات الفسيولوجية والبايوكيميائية (Prescott et al., 2005)، ولأن تكوين وانتاج إنزيم الفوسفاتيز القاعدي يبدأ خلال هذا الطور في السايروبلازم، ومن ثم يتم تصديره من خلال الغشاء البلازمي إلى الفسحة المحيطة بالبلازما (Wang et al., 2005)، كما ان فعالية الإنزيم تزداد فقط بعد عملية طيه Folding والتي لا تحدث إلا بعد أن يتم نقله إلى الفسحة المحيطة بالبلازما ومن ثم تكوين الأصرة ثنائية الكبريت (Kumar et al., 2008 ; Sone et al., 1997) والتي تعد الجزء الايضي المهم في كل من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وذلك لاحتوائها على معظم الإنزيمات الضرورية للحصول على مصادر الفوسفات والكربون (Nugent et al., 1974)، لذلك فقد تم تحديد هذا الطور والذي يقع تقريبا بين (6-22) ساعة، علما أن دراسات سابقة قد حددت هذا الطور ضمن الفترة (6-16) ساعة في كل من بكتيريا *E. coli* و *Staphylococcus aureus* (النعمان، 1998)، إن التفاوت النسبي الملاحظ في نتائج هذه الدراسة قد يرجع إلى حجم اللقاح ونوع الوسط الغذائي علما أن زيادة حجم اللقاح وإضافة وسط غذائي جديد يؤدي إلى تقصير فترة التطبع إلى بضع ساعات، فضلا عن أن مصدر عزل البكتيريا ومدى ضراوتها مؤديان دورا مهما في تحديد فترة أطوار منحنى النمو البكتيري (Koneman et al., 1997).

تم عزل إنزيم الفوسفاتيز القاعدي بعد أن تم تنمية البكتريا في الوسط الغذائي المناسب وتحضيرها لمدة (18) ساعة تقريبا، حيث كشفت الدراسة أن إنزيم الفوسفاتيز القاعدي هو من الإنزيمات داخلية الموقع (Csopak et al., 1972) بدلالة عدم وجود أية فعالية للإنزيم في الرائق الخالي من الخلايا في حين سجلت له فعالية نوعية في رائق الخلايا المتكسرة (0.05) لكون الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام يعمل كحاجز يمنع خروج الإنزيم الى الوسط المحيط بالبكتيريا (Manoil et al., 1990) كما تعمل طبقة الدهون المفسفرة الموجودة ضمن الغشاء البلازمي في كل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام إلى منع إفراز الإنزيم خارجيا، ولكون الإنزيم يقع ضمن الفسحة المحيطة بالبلازما وهو من البروتينات التي لا يتم إفرازها أبداً خارج الخلايا البكتيرية الى الوسط الزراعي النامية فيه (Beacham et al., 1976)، لذلك فقد تم الحصول على الوحدات الكلية للإنزيم من مستخلص رائق الخلايا المتكسرة وليس من رائق الخلايا الكاملة والسليمة (Intact cells) (MacAlister et al., 1972; Nugent et al., 1974) كما أشار الباحث Cheng et al., (1971) و (1970) إلى وجود الإنزيم أيضاً في الفسحة المحيطة بالبلازما لبكتيريا *Pseudomonas aerogenosa*.

تمت عملية تنقية الإنزيم بعد الحصول على المستخلص البروتيني الخام من رائق الخلايا المتكسرة بجهاز الترددات فوق الصوتية وذلك من خلال الخطوات الآتية:

الأولى: ترسيب البروتين بكريات الامونيوم، تعد هذه الخطوة من المراحل الأولى للتنقية التي يتم خلالها ترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص الخام اعتمادا على درجة تشبعها بكريات الامونيوم (Robyt and White, 1987)، لكونه من الأملاح التي تمتاز بقابليتها على الذوبان بسرعة عالية، وعدم تأثيره ف الإنزيمات (فؤده وآخرون، 1998)، واعتمادا على نوع التنافس بين كبريتات الامونيوم والبروتينات على الذوبان والاتحاد مع جزيئات الماء فتميل جزيئات البروتين إلى التجمع Aggregation

مع بعضها في التراكيز العالية من الملح والذي يرجع إلى التداخلات القوية ما بين بروتين - بروتين وتتغلب على تداخلات بروتين - مذيب (Zubay,1998)، لذلك فقد تم استخدامها في الدراسة الحالية لترسيب إنزيم الفوسفاتيز القاعدي وبنسبة تشبع (75%)، حيث أظهرت النتائج بالمقارنة مع المستخلص البروتيني الخام زيادة في الفعالية النوعية وهي تتوافق مع النتائج التي حصل عليها العديد من الباحثين الذين استخدموا كبريتات الامونيوم بنسب تشبع مختلفة (Morales et al., 2000؛ Brenna et al.,1975؛ Yamashita et al., 1990).

الثانية: عملية الفرز الغشائي، والتي تعد من الاساليب المستخدمة على نطاق واسع خلال مراحل التنقية للتخلص من الأملاح والمواد ذات الأوزان الجزيئية الواطنة في المحاليل الإنزيمية (Robyt and White, 1987) مثل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الأصغر من 14,000 دالتون وبعض المواد الكاربوهيدراتية (فؤده وآخرون، 1998)، وعلى الرغم من حدوث التخفيف للمستخلص نتيجة هذه العملية فقد لوحظت زيادة في الفعالية النوعية بحوالي ثلاث مرات عن فعاليته في المستخلص الخام وبشكل مقارب للزيادة التي أشار إليها الباحث (Kumar et al., (2008).

ثالثا: تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي، تعد هذه التقنية إحدى الطرائق المستخدمة عالميا لفصل المركبات اعتمادا على الاختلاف في حجم روغانها Elution volume (Plummer, 1978)، لذلك فقد تم استخدام هذه التقنية في فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من الترسيب بكبريتات الامونيوم (بعد أن أجريت عليها عملية الفرز الغشائي وتقليص حجمها بطريقة التجفيد باستخدام هلام السيفادكس Sephadex G-100 لكونه يفصل المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية التي تقع ضمن المدى (4,000-150,000) دالتون (Husson et al., 1989)، وقد تم الحصول على حزمتين بروتينيتين رئيسيتين (A , B) وكما هو موضح في الشكل (5) وعند قياس الفعالية الإنزيمية للحزمتين تبين أن الحزمة البروتينية (A) ذو فعالية إنزيمية عالية، وهذا يؤكد وجود نوع واحد من إنزيم الفوسفاتيز القاعدي، كما أظهرت النتائج وجود زيادة في الفعالية النوعية للإنزيم بحوالي 16.2 مرة عنه في المستخلص البروتيني الخام، والذي يؤكد حصول التنقية للإنزيم باستخدام هذه التقنية (Woolkalis and Baumann,1981)، كما أن انخفاض كمية البروتين الكلية على طول مراحل التنقية يدل على حصول التنقية للإنزيم وهذا يتوافق مع نتائج الكثير من الباحثين في الدراسات المتعلقة بهذا الجانب (Woolkalis and Baumann, 1981 ; Brenna et al., 1975 ; Csopak et al.,1972 ; Morales et al., 2000 ; Yamashita et al., 1990)، وبفضل استخدام تقنية الترشيح الهلامي تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لإنزيم الفوسفاتيز القاعدي المنقى جزيئيا حيث وجد ان وزنه الجزيئي التقريبي في بكتيريا *Staph. aureus* (51,000) دالتون وهو مقارب لما اشار اليه الباحث (Coleman (1992 أن إنزيم الفوسفاتيز القاعدي له وزن جزيئي (56,000) دالتون هو عبارة عن دايمر متماثل Homodimer.

كما أظهرت النتائج زيادة في فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل دم الفئران المحقونة ببكتيريا *Staph. aureus* مقارنة بالفعالية الإنزيمية في مصل دم الفئران غير المحقونة (السليمة) التي اتفقت مع نتائج الباحث (Sramkova, 1970) التي أشار فيها الى أن إصابة الحيوانات المختبرية بالبكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* ، تؤدي إلى الاستجابة الالتهابية والمناعية ضد الإصابة البكتيرية وإلى تحفيز إنتاج إنزيم الفوسفاتيز القاعدي ومن ثم زيادة فعاليته في مصل دم الحيوانات المصابة (Holst et al., 1998)، إن تحرر الإنزيم وزيادة فعاليته في مصل دم الفئران المحقونة ببكتيريا *Staphylococcus aureus* في هذه الدراسة قد يعود إلى امتلاك هذه البكتيريا لإنزيم Phosphotidyl inositol specific- phospholipase C الذي يعمل على تحليل الجزء Phosphotidyl inositol المرتبط بإنزيم الفوسفاتيز القاعدي بالغشاء

البلازمي للانسجة المختلفة مما يؤدي إلى زيادة تحرر الإنزيم وبالتالي زيادة كميته في مجرى دم الحيوانات المحقونة بهذه البكتيريا (Low and Finean, 1977) والذي يزداد تحرره أيضا في حالة الالتهابات والإصابات البكتيرية وإعادة التجديد والانقسام الخلوي (Abe et al., 2001)، والذي يؤكد على حقيقة كون إنزيم الفوسفاتيز القاعدي جزءا من النظام الدفاعي للحيوانات بعد الإصابة (Verweij et al., 2004). من ناحية أخرى لوحظ تحسن في صحة الحيوانات المختبرية بعد اسبوع من عملية حقنها بالبكتيريا والذي قد يعزى إلى الدور المعروف للإنزيم في إزالة عنصر الفوسفات من المركبات الفوسفاتية المختلفة وبالتالي مشاركته في العمليات الفسيولوجية المختلفة، لاسيما تلك التي تؤول الى تكوين مصادر الطاقة على شكل جزيئة ATP والحوامض النووية وغيرها من التراكيب التي يدخل ضمن تركيبها عنصر الفوسفات بشكل مباشر ومؤثر (Bradshaw et al., 1981; McComb et al., 1979) والى الدور الدفاعي للإنزيم متمثلا في إزالته للفوسفات من جزيئات ATP الخارج خلوية والتي تعد ك Pro-inflammatory (Ohta and Le Du et al., 2001) وفي إزالته للفوسفات الداخلية (Picher et al., 2003 Sitkovsky, 2001) وبالتالي تحرير الطاقة اللازمة لانجاز العمليات الفسيولوجية المتعلقة بنمو الكائن الحي وتطوره. (al., 1985)

المصادر العربية

الزبيدي، حامد مجيد (1988). علم الأحياء المجهرية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
المظفر، سامي (1999). اساسيات الكيمياء الحياتية. الطبعة الاولى، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان.
فؤده، يحيى حسن وعبدالله، محمد امين والشيمي، مجدى جمعة (1998). نظم الانزيمات وتطبيقاتها في التصنيع الغذائي. الطبعة الاولى، الدار العربية للنشر والتوزيع، مدينة نصر.
النعمان، ادبية يونس شريف حمو (1998). التأثير الجزئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Abe, T.; Abe, Y.A.; Hara, Y.; Maeda, K. (2001). Extra cellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts. *J. Cellular Physiology*, **189**, 144-151.
Andrews, P. (1965). The gel filtration behavior of Proteins related to their molecular weight over a wide range. *J. Biol. Chem.*, **96**, 595.
Baird-Parker, A. (1965). Staphylococci and their classification. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **128**, 4-25.
Beacham, I.R.; Taylor N.S.; Youell, M. (1976). Enzyme secretion in *Escherichia coli*: Synthesis of alkaline phosphatase and acid hexose phosphatase in the absence of PhQspholipid synthesis. *J. Bacteriology*, **128**, 522-527.
Berenson, G.; Radhakrishnamurthy, B.; Fishkin, A.; Dessauer, H.; Arquembourg, P. (1966). Individuality of glycoproteins in human aorta. *J. Atheroscker. Res.*, **6**, 214-223.
Bhatla, A.; Zahoor, S. (2007). *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. *J. Clinical and Diagnostic Research*, **1**, 188-197.
Bortolato, M.; Besson, F.; Roux, B. (1999). Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins*, **37**, 310-318.
Bradshaw, R.A.; Cancedda, F.; Ericsson, L.H.; Neumann, P.A.; Piccoli, S.P.; Schlesinger, M.J.; Shriefer, K.; Walsh, K.A. (1981). Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline

- phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 3473.
- Brenna, O.; Perrella, M.; Pace, M.; Pietta, P.G. (1975). Affinity-chromatography purification of alkaline phosphatase from calf intestine. *Biochem. J.*, **151**, 291-296.
- Cassate, J.; Dunman, P.M.; Murphy, E.; Projan, S.J.; Beenken, K.E.; Palm, K.J.; Yang, S.J.; Rice, K.C.; Bayles, K.W.; Smeltzer, M.S. (2006). Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agar and sar A mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiol.*, **152**, 3075-3090.
- Cathala, G.; Brunel, C. (1975). Bovine kidney alkaline phosphatase: Purification, Subunit structure, and metalloenzyme properties. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6040-6045 (C.F. Arise, R.o.2008. Scientific Research and Essay, 3, 488-494).
- Cheng, K.; Ingram, J.; Costerton, J. (1970). Alkaline phosphatase localization and spheroplast formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 1319-1324.
- Cheng, K.; Ingram, J.; Costerton, J. (1971). Interactions of alkaline phosphatase and the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **107**, 325-336.
- Coleman, J.E.; Nakamura, I.; Chlebowski, J.F. (1983). 65ZnII, 115mCdII, 60CoII, and MgII binding to alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. Structural and functional effects. *J. Biol. Chem.*, **258**, 386-395
- Csopak, H.; Garellick, C.; Hallberg, B. (1972). Purification of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Acta. Chem. Scand.*, **26**, 2401-2411.
- Dhaked, R.; Alam, S.; Dixit, A.; Singh, L. (2005). Purification and characterization of thermo-labile alkaline phosphatase from an Antarctic psychrotolerant *Bacillus* sp. P9. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 855-861.
- Fernely, H.N. (1971). "Mammalian Alkaline Phosphates in Enzymes". (Ed. Boyer, P.D.) Academic Press, New York, pp. 417-447.
- Fosset, M.; Chappellet-Tordo, D.; Lazdunski, M. (1974). Intestinal alkaline phosphatase physical properties and quaternary structure. *Biochem.*, **13**, 1783-1787.
- Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews*, **3**, 948 - 958.
- Gerard, J.T.; Berdell R.F.; Christine, L.C. (1998). "Microbiology, An Introduction". Antimicrobial Drugs. 6th ed. Addison Wesley Longman, Inc., pp. 531-538.
- Harris, L.G.; Foster, S.J.; Richards, R.G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques for identifying and Quantifying. Aurous adhesions in Relation to Adhesion to Biomaterials: Review . *LE.u Gr.o Hpaearnis Ceetl lasl and Materials* , **4**, 39 - 60.
- Hofmann, M.; Milla'n, J. (1993). Developmental expression of alkaline phosphatase genes; reexpression in germ cell tumours and in vitro immortalized germ cells. *Eur. Urol.*, **23**, 38e45.
- Holme, D.J.; Peck, H. (1988). "Analytical Biochemistry". John Wiley and Sons. Inc., New York, 86 p.
- Holst, O.; Susskind, M.; Grimmecke, D.; Brade, L.; Brade, H. (1998). Core structures of enterobacterial lipopolysaccharides. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **397**, 23-35, 1998.
- Hostacka, A.; Maytan, V.; Majtanova, L. (1993). Profile of toxic and biological activities of *Salmonella typhimurium* strains. *Biologia. Bratislava*, **48**, 677.
- Husson, M.O.; Mielcarek, C.; Gavini, F.; Caron, C.; Izard, D.; Leclerc, H. (1989). Isolation and characterization of monoclonal antibodies against alkaline phosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clinical Microbio.*, 1115-1118.
- Kim, E.; Wyckoff, H. (1990). Structure of alkaline phosphatases. *Clin. Chim. Acta.*, **186**, 175-187.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janada, W.M.; Schreckenber, P.C.; Winn, W.C. (1997). "Color Atlas

- and Textbook of Diagnostic Microbiology". 5th ed., J.B. Lippincott Com, Philadelphia, New York.
- Kumar, M.; Kaur, P.P.; Ganjewala, D. (2008). Isolation of periplasmic alkaline phosphatase from Rhizobium bacteria. *Research J. Microbiol.*, **3**, 157-162.
- Le Du, H.M.; Angielski, S.; Dubach, U. (1985). Properties of an ecto-5'- nucleotidase of the renal brush border. *Ren. Physiol.*, **8**, 321-327.
- Le Du, M.; Stigbrand, T.; Taussig, M.; M'enez, A.; Stura, E. (2001). Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å^o resolution. Implication for substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9158-9165.
- Liang, Y.; Blake, R.E. (2006). Oxygen isotope signature of Pi regeneration from organic compounds by phosphomonoesterases and photooxidation. *Geochimical Cosmochimica Acta.*, **70**, 3957-3969.
- Low, M.G.; Finean, J.B. (1977). Release of alkaline phosphatase from membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.*, **167**, 281 - 284.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England J. Medicine*, **339**, 520 -532.
- MacAlister, T.J.; Costerton, J.W.; Thompson, L.; Ingram, J.M. (1972). Distribution of alkaline phosphatase within the periplasmic space of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **111**, 827-832.
- Malik, B.S. (1996) . "Pathogenic Bacteriology and Mycology". 4th ed. CBS Publ. Dist. India.
- Manoil, C.; Mekalanos, J.; Beckwith, J. (1990). Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.*, **172**, 515-518.
- McComb, R.; Bowers, G.; Posen, S. (1979). Alkaline phosphatase. Plenum Press, New York, 189-228 (C.F. Pickkers, P. 2008. *Eur. J. Clin. Pharmacol*).
- Michaelis, S.; Beckwith, J.(1982). Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annual Review Microbiol.*, **36**, 435-465.
- Morales, A.C.; Nozawa, S.R.; Thedei, G.J.; Maccheroni, W.J.; Rossi, A. (2000). Properties of a constitutive alkaline phosphatase from strain 74A of the mold *Neurospora crassa*. *Brazilian J. Medical and Biological Research*, **33**, 905-912.
- Moss, D.W.; Eaton, R.H.; Smith, J.K.; Whitby, L. (1966). Alteration in the electrophoretic mobility of alkaline phosphatases after treatment with neuraminidase. *Biochem. J.*, **98**, 32-33. (C.F. Warnes, T.W. 1972. *Gut.*, **13**, 926-937).
- Namura, S.; Nishijima, S.; Higashida, T.; Asada, Y. (1995). *Staphylococcus aureus* isolated from nostril anteriors and subungual spaces of the hand: comparative study of medical staff, patients, and normal controls. *J. Dermatol.*, **22**, 175-80.
- Noble, W.C. (1998). Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. *Br. J. Dermatol.*, **53**, 9-12.
- Nugent, K.M.; Hufte, E.; Cole, R.M.; Theodore, T. S. (1974). Cellular location of degradative enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **120**, 1012-1016.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus poisoning. *J. Anatomy*, **17**, 24 – 58 (C.F. de Jong, O.G. 2010. Graduate School of Life Sciences).
- Ohta, A.; Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down regulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, **414**, 916-920 (C.F. Pickkers, P. 2008. *Eur. J. Clin. Pharmacol*).

- Picher, M.; Burch, L.; Hirsh, A.; Spychala, J.; Boucher, R. (2003). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13468–13479.
- Plummer, T.D. (1978). "An Introduction to Practical Biochemistry". 2nd ed., McGraw - Hill Book Comp., U. K.
- Prescott, L.M.; Harely, T.P.; Klein, D.A. (2005). "Microbiology". 4th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., USA.
- Robyt, F.J.; White, J.B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books/ Cole Publishing Com. U S A.
- Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem.*, **51**, 654-655 .
- Sone, M.; Kishigami, S.; Yoshihisa, T.; Ito, K. (1997). Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6174-6178.
- Sowadaki, J.M.; Handschumacher, M.D.; Murthy, K.; Foster, B.A.; Wyckoff, H.W. (1985). Refined structure of Alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **186**, 417 – 433.
- Sramkova, L. (1970). Alkaline phosphatase in neutrophil leucocytes in infectious diseases. *Acta Univ. Carol. Med. Monogr.*, **43**, 1–111.
- Trowsdale, J.; Martin, D.; Bicknell, D.; Campbell, I. (1990). Alkaline phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 78–180.
- Verweij, W.R.; Bentala, H.; der Vlag, A.H.; Loenen-Weemaes, A.M.; Kooi, K.; Meijer, D.K.F.; Poelstra, K. (2004). Protection against an *Escherichia coli*-Induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. *Shock*, **22**, 174–179.
- Wang, J.; Stieglitz, K.A.; Kantrowitz, E.R. (2005). Metal specificity is correlated with two crucial active site residues in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry*, **44**, 8378–8386.
- Waynforth, H.B. (1980). "Experimental and Surgical Technique in the Rat. Academic press Inc. (London) L.T.D.N.WI., 29 p.
- Woolkalis, M.J.; Baumann, P. (1981). Evolution of alkaline phosphatase in marine species of *Vibrio*. *J. Bacteriol.*, **147**, 36-45.
- Wyckoff, H. (1987). Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism (Ed. Torriani-Gorini, A.; Rothman, F.G.; Silver, S.; Wright, A.; Yagil, E.) American Society of Microbiology Press, Washington, D. C., pp. 118-126.
- Yamashita, Y.; Toyoshima, K.; Yamazaki, M.; Hanada, N.; Takehara, T. (1990). Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase of *Bacteroides gingivalis* 381. *Infection and Immunity*, **58**, 2882-2887.
- Zubay, G.L. (1998). "Biochemistry". 4th ed., McGraw-Hill Comp. Inc., USA., pp. 964, 1962.